

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月30日

出願番号
Application Number: 特願2002-255126
[ST. 10/C]: [JP2002-255126]

REC'D 17 OCT 2003

WIPO

PCT

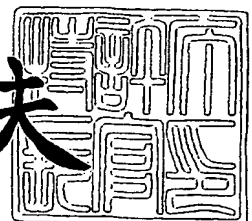
出願人
Applicant(s): 株式会社ニチレイ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0367

【提出日】 平成14年 8月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 ビブリオ ブルニフィカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法

【請求項の数】 50

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 小泉 雄史

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 西山 葉子

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 山本 敏

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市渕野辺 1-17-71 麻布大学環境保健学部内

【氏名】 福山 正文

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市渕野辺 1-17-71 麻布大学環境保健学部内

【氏名】 古畑 勝則

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市渕野辺 1-17-71 麻布大学環境
保健学部内

【氏名】 大仲 賢二

【特許出願人】

【識別番号】 000134970

【氏名又は名称】 株式会社 ニチレイ

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9913335

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビブリオ ブルニフィカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表中の配列番号1のDNAジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子(gyrB)中でビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738、又は804のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号1で表される遺伝子の断片。

【請求項 2】 配列表中の配列番号1のDNAジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子(gyrB)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738、又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

【請求項 3】 請求項2で指定されたビブリオ ブルニフィカスに特有な位置を高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4】 配列表中の配列番号1の位置番号3及び15の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 5】 配列表中の配列番号1の位置番号121、123、132、136、138、又は139の位置のいずれか 2 以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 6】 配列表中の配列番号1の位置番号549及び557の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 7】 配列表中の配列番号1の位置番号700及び701の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項3記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 8】 配列表中の配列番号1の位置番号726、727、728、734、735、又は738の位置のいずれか 2 以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項 3

記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 9】 3'末端の塩基が該ビブリオ ブルニフィカスに特有な請求項2で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 10】 5'-gtgtctggcggtctt-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 11】 5'-gatgcaccgcttgctatcatc-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 12】 5'-tgcggacttyacttcrcct-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 13】 5'-gtccatgtagctgttcart-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 14】 5'-ttgtctgccatgaaggattcc-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 15】 配列表中の配列番号1のDNAジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子(gyrB)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738、又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含むビブリオ ブルニフィカス検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 16】 配列表中の配列番号2のRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570、686、689、732、750、又は756のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号2で表される遺伝子の断片。

【請求項 17】 配列表中の配列番号2のRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570

、686、689、732、750、又は756のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

【請求項18】 請求項17で指定されたビブリオ プルニフィカスに特有な位置を高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項19】 配列表中の配列番号2の位置番号21及び33の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項20】 配列表中の配列番号2の位置番号120及び126の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項21】 配列表中の配列番号2の位置番号312及び315の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項22】 配列表中の配列番号2の位置番号340及び354の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項23】 配列表中の配列番号2の位置番号396及び414の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項24】 配列表中の配列番号2の位置番号459及び462の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項25】 配列表中の配列番号2の位置番号686及び689の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項26】 配列表中の配列番号2の位置番号732、750、又は756の位置のいずれか2以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項18記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項27】 3'末端の塩基が該ビブリオ プルニフィカスに特有な請求項17で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項17記載の遺伝子増幅プライマー

【請求項28】 5'-aatcgacatcgctaamcga-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項29】 5'-gttcgacaaagtacaagcg-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 30】 5'-tcaagcagygttcagag-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 31】 5'-aatggcgctagagaag-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 32】 5'-cktraatgaacatggtcga-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 33】 5'-gaactgatgctcgatgtgttt-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 34】 5'-aatgtcttcttcgtgmagyt-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 35】 5'-ttgatgttgtytyactgaaagc-3' 及び対応する相補鎖を含む請求項17記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 36】 配列表中の配列番号2のRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570、686、689、732、750、又は756のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含むビブリオ ブルニフィカス検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 37】 配列表中の配列番号3のRecAをコードする遺伝子(recA)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号9、81、138、153、172、180、208、228、237、288、又は540のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号3で表される遺伝子の断片。

【請求項 38】 配列表中の配列番号3のRecAをコードする遺伝子(recA)中で、ビブリオブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号9、81、138、153、172、180、208、228、237、288、又は540のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

【請求項 39】 請求項38で指定されたビブリオ ブルニフィカスに特有な位置を高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 0】 配列表中の配列番号3の位置番号138、153の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項39記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 1】 配列表中の配列番号3の位置番号172及び180の位置の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項39記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 2】 配列表中の配列番号3の位置番号208、228、237の位置のいずれか2以上の塩基を含む鎖又はその相補鎖を含む請求項39記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 3】 3'末端の塩基が該ビブリオ ブルニフィカスに特有な請求項39で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項39記載の遺伝子増幅プライマー

【請求項 4 4】 5'-cctgtgtatgcgaagaarctt-3'及び対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 5】 5'-tatcgaccarttrtttggtta-3'及び対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 6】 5'-aagmgcatcacagatttccaa-3'及び対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 7】 5'-tcaaccgcmcctgagcgagca-3'及び対応する相補鎖を含む請求項38記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 8】 配列表中の配列番号3のRecAをコードする遺伝子(recA)中で、ビブリオ ブルニフィカス菌群に特有な次の位置番号9、81、138、153、172、180、208、228、237、288、又は540のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含むビブリオ ブルニフィカス検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 4 9】 請求項2-14、17-35、38-47のいずれか1項に記載のプライマーを用いるビブリオ ブルニフィカスを検出、定量又は同定する方法。

【請求項 5 0】 請求2-14、17-35、38-47のいずれか1項に記載のプライマーを用いるビブリオ ブルニフィカスを検出、定量又は同定するキット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、食品検査、疫学的環境検査、並びに臨床検査における、ビブリオブルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) の検出・同定・計数方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ビブリオブルニフィカスは、海水や汽水域に生息する好塩性グラム陰性細菌である。健康人への感染は稀であるが、肝硬変などの重度の基礎疾患を持つ患者には感染して重篤な感染症を起こすことがあり、死亡例を伴う感染菌として公衆衛生の立場から注目されている。本菌による感染症は1970年にRolandにより下肢壊疽から分離された (New Engl. J. Med., 282, 1306, 1970) のが最初の報告例であるが、当初は腸炎ビブリオの腸管外感染例とされていた。その後、この菌が大腸菌などと比較して反応が遅いが乳糖分解能をもつこと、8%食塩の存在下では増殖できないことなどが明らかになり、1979年Farmerによりビブリオブルニフィカスと命名された (Lancet, ii, 903, 1979)。

【0003】

本菌は生物学的性状から生物型1～3型に分類されている (Appl. Environ. Microbiol., 63, 1460-1466 1997, Lancet, 354, 1421-1424 2000)。ヒトの感染症から分離されるのは主として1型であり、2型は主に魚の病原菌として分離される。また、3型は1996年～1997年に起きたイスラエルでの集団感染の病原菌として分離された (Lancet, 354, 1421-1424 2000)。

本菌による感染様式には経口感染型と創傷感染型がある。経口感染は主として夏場に生の魚介類を喫食することにより感染し、24時間以内に発熱、腹痛、下痢、嘔吐などの消化器病の症状を経た後に敗血症を併発し、平均48時間で死に至る。死亡率は50～70%と非常に高い。また、創傷感染は創傷への海水の接触により感染し、12時間の潜伏期間を経て1週間以内に発症する。致死率は経口感染よりは低く25%である。米国では1988年～1996年までに22州で422事例の報告があり、その感染源は、米国の食習慣から生牡蠣摂取による場合が多数を占めている。一方、我が国でも関東以西の太平洋側で約90事例の報告があり、刺身、鮓など生の魚介類の喫食が感染の主な原因となっている。最近では、2001年7月に熊本で、生のシャコ、

コチの喫食により4名が感染し、うち2名が死亡するなど、魚介類の生食文化を有するわが国では、ビブリオブルニフィカス感染症は警戒すべき感染症であるといえる。

【0004】

本菌の選択的分離には、主として腸炎ビブリオ同様TCBS寒天培地が用いられてきた。ビブリオブルニフィカスは、TCBS培地上で腸炎ビブリオとよく似た緑青色のコロニーを形成し、その判別のためには種々の生化学的性状の確認を行う必要があり、煩雑である上誤判定の危険を伴っている。一方で、SPS agar (SDS-poly mix in B sucrose agar) 培地 (FEMS Microbiol. Lett., 17, 205-209 1983) や cellobiose-collistin agar 培地 (Appl. Environment. Microbiol., 64, 1721-1724 1998) などの改良選択分離培地も報告されているが、生化学的性状の確認作業を行うことに変わりはない。

【0005】

一方、これまでに、他の食中毒菌と同様に、遺伝子工学的手法を応用したビブリオブルニフィカスの検出法が幾つか開発されている。wzaは、莢膜多糖CPS (capsular polysaccharide) をペリプラズムから外膜へ移動させるのに必要なトランスポーターをコードする遺伝子としてE.coliで見出された遺伝子である。ビブリオブルニフィカスでは莢膜の無い株がマウスに対する毒性を示さないこと、および、wza欠損株がマウスに対する病原性を失うこと (Infect. Immun. 69, 6893-6901 2001) から、病原性の一つと考えられている。そこで、病原性を持つビブリオブルニフィカスを検出する手段としてwza遺伝子を標的としたプライマーがWrightらによって開発された (U.S. Patent 6183973, Feb., 6, 2001)。しかし、ビブリオブルニフィカスの病原因子はCPSに限られないため、病原性を持つビブリオブルニフィカスを全て検出できるとは限らない。また、同じくビブリオブルニフィカスの病原因子の一つとされているヘモリシン遺伝子(vvh : *Vibrio vulnificus* hemolysin) を標的としたプライマーが開発されている (Appl. Environ. Microbiol. 57, 707-711 1991)。このプライマーはvvh遺伝子がビブリオブルニフィカスに特異的な遺伝子であるものとして設計されているが、一方でV. choleraeやV. mimicusが有するヘモリシン遺伝子もvvh遺伝子と相同性を示

すことが報告されており (Infect. Immun. 58, 2706-2709 1990、Infect. Immun. 65, 1830-1835 1997)、さらにプライマーの設計にあたり、これらのヘモリシン遺伝子との比較が行われていないことから、特異性の検証が十分とは言えない。

以上のように、既存の遺伝子を用いたビブリオブルニフィカス検出方法は、特異性が十分とは言えないものであった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従来の遺伝子検査方法に共通している点は、細菌の「種」が遺伝的な多様性を内包する集団である事を無視していることである。ある細菌集団のメンバーと推測される1菌株の塩基配列を、その集団共通の、あるいは代表する配列として用いる事は、中立的変異を速やかに蓄積する遺伝子の分子進化の性質上大変危険である。即ち、本来検出されるべき菌株がプライマー領域の僅かな変異の為に増幅が阻害されて検出されなかったり、プライマーの特異性が十分でないために検出されるべきでない近縁株が検出されるといった誤判定の原因になる事が危惧される。そこで、特異性のバックグラウンドが証明されており、誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオブルニフィカスの検出・同定・定量用特異遺伝子増幅プライマー及びプローブの作成が必要とされていた。

【0007】

【発明の実施の形態】

細菌のある系統群の遺伝子の特異的に検出する方法を作成する為には、検出しようとする生物群、ならびにその系統的に近縁な生物群の塩基配列をなるべく多数収集する必要がある。また、特異検出のターゲットとする遺伝子は、最も近縁の生物とも判別可能なように、十分に異なる塩基配列を有している必要がある。この為には、十分に早い進化速度を有していなくてはならない。また、高頻度に水平伝播する遺伝子（たとえば腸炎ビブリオの毒素遺伝子）の様に、系統とは無関係に存在する遺伝子を用いる事が出来ない。本発明でターゲットとして用いた *gyrB* 遺伝子、*rpoD* 遺伝子及び *recA* 遺伝子がコードするタンパク質は、生存に必須

なタンパク質である。この為、水平伝播し難く、また適度な進化速度を有しているため、細菌の系統解析に適している。発明者らは、既にgyrB遺伝子及びrpoD遺伝子のPCRダイレクトシーケンス法による簡便な塩基配列の決定方法を開発している（特開平07-213229、特開平08-256798）。

【0008】

さらに、発明者らは、既に多数のビブリオブルニフィカスを環境より単離しており、他方に、公知のビブリオブルニフィカス保存株及び、16S rRNA配列に基づく解析により本菌に近縁であることが報告されている*V. navarrensis*, *V. diazotrophicus*, *V. ordalii*, *Listonella anguillarum*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *V. mimicus*, *V. chorelae* (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 1449-1456(2001)) について、下記表1に示される菌株のgyrB、rpoDおよびrecA遺伝子の部分塩基配列を解析し、その配列に基づいた分子系統解析を行い、その系統関係を明らかにした。

【0009】

【表 1】

表1. 使用した菌株

<i>V. vulnificus</i>	32株	ATCC 27562 T	
		ATCC 29306	
		ATCC 29307	
		ATCC 33147	
		ATCC 33148	
		ATCC 33149	
		ATCC 33814	
		ATCC 33815	
		ATCC 33816	
		ATCC 33817	
		ATCC 43382	
		ATCC BAA-86	
		ATCC BAA-87	
		ATCC BAA-88	
		ATCC BAA-89	
		ATCC BAA-90	
		JCM 3726	
		JCM 3727	
		JCM 3728	
		JCM 3729	
		JCM 3730	
		JCM 3731	
		環境分離株	10株
その他のビブリオ属保存株	48株		
<i>V. cholerae</i>	29株	臨床分離株	29株
<i>V. mimicus</i>	4株	ATCC 33653 T	
		ATCC 33654	
		ATCC 33655	
		ATCC 700326	
<i>V. diazotrophicus</i>		ATCC 33466 T	
<i>V. navarrensis</i>		ATCC 51183 T	
<i>V. metschnikovii</i>		ATCC 700040 T	
<i>V. cincinnatiensis</i>		ATCC 35912 T	
<i>V. ordalii</i>		ATCC 33509 T	
<i>Listonella anguillarum</i>		ATCC 19264 T	
<i>V. hollisae</i>		ATCC 33564 T	
<i>V. alginolyticus</i>		IFO 15630 T	
<i>V. campbellii</i>		IFO 15631 T	
<i>V. carchariae</i>		IFO 15632 T	
<i>V. harveyi</i>		IFO 15634 T	
<i>V. nereis</i>		IFO 15637 T	
<i>V. parahaemolyticus</i>		IFO 12711 T	
<i>V. proteolyticus</i>		IFO 13287 T	
<i>V. tubiashii</i>		IFO 15644 T	
		食品由来分離株	5株

合計85株

【0010】

即ち、上記表 1 に示される供試菌株を2%NaCl添加ブレインハートインフュー

ジョン培地で増菌培養した後に、PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra SYSTEM S) を用いて染色体DNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として、gyrB増幅ユニバーサルプライマーUP-1E (5'-caggaaacagctatgaccaygsnggnggnaarttyra-3') およびAprU (5'-tgtaaaacgacggccagtgcnggrtcytttytctgrca-3') を用いて約900bp (大腸菌K-12株上の塩基配列上のポジション331 - 1212; アミノ酸配列ではポジション111から 404に相当する領域) のgyrB遺伝子断片をPCR増幅した。また同様にrpoD増幅ユニバーサルプライマー70F-M13 (5'-caggaaacagctatgaccyatgmnggaratgggnacngt-3') および70R-M13 (5'-tgtaaaacgacggccagtngcytcnaccatytcytttytt-3') を用いて約800bp (大腸菌K-12株上の塩基配列上のポジション334 - 1125; アミノ酸配列ではポジション112から 376に相当する領域) のrpoD遺伝子断片をPCR増幅した。さらに、recA遺伝子増幅ユニバーサルプライマー-recUFおよびrecUR (recUF: caggaaacagctatgaccatggaygtngaracnat, recUR: tgtaaaacgacggccagttanswrtaccangcncc) を用いて648bp (大腸菌K-12株上の塩基配列ポジション172-819; アミノ酸配列ではポジション58-273に相当する領域) のrecA遺伝子断片をPCR法により増幅した。増幅反応は、耐熱性DNAポリメラーゼ (AmpliTaq Gold: Applied Biosystems製) を用い、GENE MATEサーマルサイクラー (ISC BioExpress) を使用して行った。反応液はDNA 1 μ g, 50mMKCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン、各0.2mMのdNTP, 2.5UのAmpliTaq Gold、プライマー各1 μ Mを含む溶液を50 μ lに調製した。反応条件は、AmpliTaq Goldの活性化(95°C・10分間)に続いて、94°C・1分間、アニール (gyrB、rpoDは56°C、recAは54°C) 1分間、72°C・2分間の反応を40サイクル行った後に、72°C・10分間の伸長反応を行った。得られたPCR産物は、1%アガロースゲル (SeaPlaque GTG agarose: BioWhittaker Molecular Applications製) で電気泳動 (0.5xTAE、100V・30分間) 後、臭化エチジウムで10分間染色した。紫外線照射下で増幅産物の存在を確認し、ゲルより切り出した後、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega製) を用いて精製し、シーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応は、ユニバーサルプライマーに予め付加してあるM13R (5'-CAGGAAACAGCTATgACC-3')、M13-21配列 (5'-TgTAAACgACggCCAgT-3') をプライマーとして、ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems製) を用い、GENE MATEサーマルサイクラー (ISC Bio

Express) を使用して行った。反応液は、DNA20ng、プライマー3.2pmol、BigDye Terminator Ready Reaction Mix8 μ lを混合し、最終体積20 μ lに調製した。サイクルシーケンス反応は、92℃・10分間の加熱後、96℃・10秒、50℃・5秒、60℃・4分の反応を25サイクル行った。塩基配列の解析にはABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems製) を用いた。得られた塩基配列を用いて分子系統解析を行うにあたり、ビブリオブルニフィカスの近縁種をより正確に把握するために、gyrB、rpoDおよびrecA遺伝子部分配列を結合させた後に解析を実施した。即ち、上記3遺伝子配列を結合した上でClustal Wコンピュータプログラムを用いて多重アラインメント解析を行った後、PHYLIPコンピュータプログラムパッケージを用い、木村の2パラメーターモデル (J. Mol. Evol. (1980) Vol. 16, No. 2, p. 111-20) で算出した遺伝的距離に基づいて近隣結合法 (Mol. Biol. Evol. Vol. 4, No. 4, 406-425) により分子系統樹を作製した。

【0011】

この結果、ビブリオブルニフィカスは解析に供した全ての株が、ビブリオ属菌株中で独立した単系統をなすことが明らかとなった (図1)。即ち、この系統に属する細菌群がビブリオブルニフィカスと判定されるべきことが示唆された。

【0012】

そこで、ビブリオブルニフィカス菌群のみを検出可能な遺伝子検査法を確立するために、まず、近縁種間の塩基配列の差異を明らかとした。即ち、ビブリオブルニフィカス群内では保存され、他のビブリオ属細菌とは異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオブルニフィカスが属する系統群のコンセンサス配列を求めると共に、分子系統解析の結果から本系統に近縁であることが判明した図1中C1～C3の系統のコンセンサス配列を比較し、系統特異的情報図を作成した (図2、3、4)。図2～4より、gyrB遺伝子においては、配列表中の配列番号1の位置番号3、15、69、95、121、123、132、136、138、139、231、424、549、557、603、700、701、726、727、728、734、735、738又は804の位置、rpoD遺伝子においては配列中の配列番号2の位置番号21、33、60、120、126、235、260、312、315、340、354、396、414、459、462、570、686、689、732、750又は756の位置、さらにrecA遺伝子においては配列表中の配列番号3の位置番号9、81、1

38、153、172、180、208、228、237、288又は540の位置がビブリオブルニフィカスに属する系統に特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含む本系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する15塩基以上のgyrB、rpoDおよびrecA遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上40塩基以下の連続するgyrB、rpoDおよびrecA遺伝子の塩基配列を用いてプライマーを設計することが可能となる。同様に、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する15塩基以上のgyrB、rpoDおよびrecA遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上で100塩基以下の連続するgyrB、rpoDおよびrecA遺伝子の塩基配列を用いて、プローブを設計することが可能となる。さらに、当該プライマーおよびプローブの作成には、上記相違塩基を高頻度で含む領域、例えば、gyrB遺伝子においては、121、123、132、136、138、139のいずれかの位置を2以上含む領域、726、727、728、734、735、738のいずれかの位置を2以上含む領域、rpoD遺伝子においては、459、462を含む領域、732、750、756のいずれかの位置を2以上含む領域、さらにrecA遺伝子においては138、153を含む領域、228、237を含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合、3末端がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることが望ましい。本件発明は、これらプライマーおよびプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオブルニフィカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

【0013】

本発明のプライマーの遺伝子増幅方法は、PCR法に限定されない。プライマーの特異性に基づく特異増幅方法、あるいは増幅の特異的阻害方法に用いる事が可能である。また、同様に特異増幅プライマーと標識特異プローブの組み合わせによる定量増幅反応にも用いる事が出来る。また、本件発明のプローブは単独で用いる事も可能である。その使用方法は、固相あるいは液相に限定されない。

【0014】

サイバークリーンなどの増幅した二本鎖DNAを検出する試薬を用いて行なうり

アルタイムPCRやFRET等を応用したりアルタイムPCRを行なう際のプライマー及びプローブとしても利用可能である。

【0015】

【実施例】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。実施例はその一態様であり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕

本発明により得られた、ビプリオブルニフィカスに特異的である領域を用いて設計した表2に示される遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。

【0016】

【表 2】

表2. ビブリオブルニフィカス特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置 ^{a)}	方向
<i>gyrB</i>	VF1	5'-gatgcaccgctgtctatcatc-3'	21	121 - 141	センス
	VR1	5'-ttgtctgcatgaaggattcc-3'	21	740 - 720	アンチセンス
<i>rpoD</i>	VrF2	5'-gaactgatgctcgatgtgttt-3'	21	442 - 462	センス
	VrR2	5'-ttgatgttgytyactgaaagc-3'	21	770 - 750	アンチセンス
<i>recA</i>	VVrecF2	5'-cctgtgtatgcgaagaarctt-3'	21	133 - 153	センス
	VVrecR2	5'-tcaaccgcmcctgagcgagca-3'	21	248 - 228	アンチセンス

a) : 配列番号1～3で表される塩基配列中での5'末端からの位置を示している。

【0017】

尚、請求項11、14、33、35、44および47に記載のプライマーはそれぞれ表2中のVF1、VR1、VrF2、VrR2、VVrecF2およびVVrecR2にあたる。

供試菌株から抽出した染色体DNAを鋳型としたPCRを行った。増幅反応は、耐熱性DNAポリメラーゼ（AmpliTaq Gold：Applied Biosystems製）を用い、GENE MATE サーマルサイクラー（ISC BioExpress）を使用して行った。反応液はDNA 0.1 μ g、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl₂、0.01% ゼラチン、各0.2mMのdNTP、2.5UのAmpliTaq Gold、プライマー（濃度は表3参照）を含む溶液を最終体積20 μ lに調製した。反応条件は、AmpliTaq Goldの活性化（95℃・10分間）に続いて、94℃1分、アニール（gyrB遺伝子の場合65℃、rpoD遺伝子の場合63℃、recA遺伝子の場合65℃）1分、72℃1分を35サイクル行い、最後に72℃10分の伸長反応を行った。プライマーの組み合わせと増幅反応条件を表3に示した。

【0018】

【表 3】

表3. ビブリオブルニフィカス特異検出用プライマー-PCR条件

標的遺伝子	PCR条件				
	センスプライマー	センスプライマー	増幅産物(bp)	アニール温度(°C)	サイクル数
<i>gyrB</i>	VF1	VR1	620	65	35
					0.1
<i>rpoD</i>	VrF2	VrR2	329	55	35
					0.1
<i>recA</i>	VVrecF2	VVrecR2	116	60	35
					0.1

【0019】

増幅後の反応液 5 μ l を、1%アガロースゲル（アガロース S：（株）ニッポ
ンジーン製）で電気泳動後（0.5xTAE、100V・30分間）、臭化エチジウムで染色
し、紫外線照射下で遺伝子の増幅の有無を確認した。*gyrB*遺伝子を標的としたプ

ライマーVF1とVR1、rpoD遺伝子を標的としたVrF2とVrR2、及びrecA遺伝子を標的としたVVrecF2とVVrecR2の組み合わせを用いて、表 1 に示した菌株由来のDNAをPCR法によりスクリーニングした結果を表 4 に示す。図 1 においてビブリオブルニフィカスに属するとされた菌株由来のDNAのみから増幅産物が確認され、共にビブリオブルニフィカスのみを検出可能であることが判明した。

【 0 0 2 0 】

【表 4】

表4. *V. vulnificus* 特異検出プライマーによるPCRの実施結果

通 号	クラスター	名 称	株 名 称	VF1&VR1	PCR VF2&VR2	WrecF2&WrecR2
1	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562 T	+	+	+
2	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29306	+	+	+
3	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29307	+	+	+
4	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33147	+	+	+
5	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33148	+	+	+
6	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33149	+	+	+
7	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33814	+	+	+
8	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33815	+	+	+
9	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33816	+	+	+
10	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33817	+	+	+
11	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 43382	+	+	+
12	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-86	+	+	+
13	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-87	+	+	+
14	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-88	+	+	+
15	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-89	+	+	+
16	V.v	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-90	+	+	+
17	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3726	+	+	+
18	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3727	+	+	+
19	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3728	+	+	+
20	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3729	+	+	+
21	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3730	+	+	+
22	V.v	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3731	+	+	+
23	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.4	+	+	+
24	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.9	+	+	+
25	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.60	+	+	+
26	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.74	+	+	+
27	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.81	+	+	+
28	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.130	+	+	+
29	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.196	+	+	+
30	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.202	+	+	+
31	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.496	+	+	+
32	V.v	<i>V. vulnificus</i>	No.965	+	+	+
33	C3	<i>V. cholerae</i>	DU1	-	-	-
34	C3	<i>V. cholerae</i>	DU2	-	-	-
35	C3	<i>V. cholerae</i>	DU3	-	-	-
36	C3	<i>V. cholerae</i>	DU6	-	-	-
37	C3	<i>V. cholerae</i>	DU19	-	-	-
38	C3	<i>V. cholerae</i>	DU63	-	-	-
39	C3	<i>V. cholerae</i>	DU81	-	-	-
40	C3	<i>V. cholerae</i>	DU94	-	-	-
41	C3	<i>V. cholerae</i>	T2	-	-	-
42	C3	<i>V. cholerae</i>	T6	-	-	-
43	C3	<i>V. cholerae</i>	T97	-	-	-
44	C3	<i>V. cholerae</i>	T98	-	-	-
45	C3	<i>V. cholerae</i>	T116	-	-	-
46	C3	<i>V. cholerae</i>	NM20	-	-	-
47	C3	<i>V. cholerae</i>	NM26	-	-	-
48	C3	<i>V. cholerae</i>	NM48	-	-	-
49	C3	<i>V. cholerae</i>	NM67	-	-	-
50	C3	<i>V. cholerae</i>	NM84	-	-	-
51	C3	<i>V. cholerae</i>	NM85	-	-	-
52	C3	<i>V. cholerae</i>	Q37	-	-	-
53	C3	<i>V. cholerae</i>	Q57	-	-	-
54	C3	<i>V. cholerae</i>	Q59	-	-	-
55	C3	<i>V. cholerae</i>	Q66	-	-	-
56	C3	<i>V. cholerae</i>	Q70	-	-	-
57	C3	<i>V. cholerae</i>	Q90	-	-	-
58	C3	<i>V. cholerae</i>	K47	-	-	-
59	C3	<i>V. cholerae</i>	OPC24	-	-	-
60	C3	<i>V. cholerae</i>	OPC39	-	-	-
61	C3	<i>V. cholerae</i>	OPC60	-	-	-
62	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33653 T	-	-	-
63	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33654	-	-	-
64	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33655	-	-	-
65	C3	<i>V. mimicus</i>	ATCC 700326	-	-	-
66	C2	<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC 33466 T	-	-	-
67	C1	<i>V. nautarans</i>	ATCC 51183 T	-	-	-
68	C2	<i>V. metschnikovii</i>	ATCC 700040 T	-	-	-
69	C2	<i>V. cincinnatiensis</i>	ATCC 35912 T	-	-	-
70	C2	<i>V. ordalii</i>	ATCC 33509 T	-	-	-
71	C2	<i>Listonella anguillarum</i>	ATCC 19264 T	-	-	-
72	C4	<i>V. elkinolyticus</i>	IFO 15630 T	-	-	-
73	C4	<i>V. campbellii</i>	IFO 15631 T	-	-	-
74	C4	<i>V. carchariae</i>	IFO 15632 T	-	-	-
75	C4	<i>V. herveyi</i>	IFO 15634 T	-	-	-
76	C4	<i>V. nereis</i>	IFO 15637 T	-	-	-
77	C4	<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO 12711 T	-	-	-
78	C4	<i>V. proteolyticus</i>	IFO 13287 T	-	-	-
79	C4	<i>V. tubiashii</i>	IFO 15844 T	-	-	-
80	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V11	-	-	-
81	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V41	-	-	-
82	C4	<i>Shewanella</i> sp.	V52	-	-	-
83	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V65	-	-	-
84	C4	<i>Vibrio</i> sp.	V70	-	-	-
85		<i>V. holisae</i>	ATCC 33564 T	-	-	-

【0021】

【発明の効果】

本件発明のgyrB、rpoD、及びrecA遺伝子プライマー及びプローブは、ビブリオ

ブルニフィカスとの系統関係を把握した上で設計したものであるため、特異性を向上させる検討が行われており、検出精度という点で優れている。従って、食品、臨床検体などから菌を単離せず、近縁細菌種が夾雑している状況で直接検出する場合に有利になる。

【 0 0 2 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nichirei K.K

<120> Method of the detection of *Vibrio vulnificus* and primers and probes therefor

<130> P02-0367

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 885

<212> DNA

<213>

<400> 1

gtgtctggcg gtcttcacgg tgtwgyggtt tcggtggtra acgcaytgtc tgaaaaagtr 60

ctrytkacga ttcacgtgg tggcatacy cayagccaaa cctatcgta tgggtgcct 120
gatgcaccgc ttgctatcat cggygatacy gaaaaaacg gtaccacggg acgtttctgg 180
ccaagtgcks aaaccttcas caacatcgaa tttcattatg acatcctagc gaagcgtyta 240
cgtgagctct ctttyctgaa ctckggcgtg tckatcaaac tgtttgatga gcgcgaagaa 300
gataagraag atcacttcat gtatgaagggt ggtattcaag cgtytytyac tcacttgaac 360
cgcaacaara cmcccatcca tgaaaaagta ttccatttya aykcygagcg tgaagacggk 420
attgckgttg aagtggcgat gcagtggaa gatggyttcc aagaaaacat ctactgtttt 480
accaacaaca tcccacagcg tgayggtgg acccacttag cgggtttccg ygcggcattg 540
acgcgcacay tgaacagcta catggacaaa gaaggytact craagaaagc gaaaaccgcg 600
acttctggyg aygatgcgcg tgaaggtttg acygcwgyt tttcagthaa agtrccggat 660
ccaaaattct caagccaaac yaaagacaaa ctggtttcta gygaagtraa gtccgcagt 720
gaatccttca tggcagacaa actgaacgac ttcttrgcyg arcaccaag cgaagcga 780
accgtttgtt ctaagattat cgacgccgca cgtgcgcgtg aagcagcrg taaagcgcgt 840
gaaatgacrc gccgtaaagg ggcrttagay cttgtggcc ttccw 885

<210> 2

<211> 819

<212> DNA

<213>

<400> 2

actcgtgaag gcgaaatcga catcgctaam cgaattgaag atggtatcaa ccaagtacag 60
tcstctgttg ctgaataccc aggaaccatt cttatatc tkgaacagtt cgacaaagta 120
caagcggaag aacttcgcct mactgatctt atcagtgggt ttgttgatcc aaatgcagat 180
gaaacggcwg ctccaaccgc aacacacaty ggttcagagc ttgcagaatc tgatttggaa 240
gatgaagaca ayaccgacat cgacgatgaa gacgaagayn nnnngaaga tggcgattca 300
agcagyatt cagaggamga tgtcggcatc gaccctgaaa tggcgctaga gaagttyact 360
carcttcgta acagctayca gaatctgcaa cttgccktra atgaacatgg tcgagagagt 420

gctcaaacag ctcaagccca tgaactgatg ctcgatgtgt ttaaagagtt tcgtctaacd 480
ccgaagcagt ttgaccattt ggtaacgaa cttgcacgcg cyatggatcg cgttcgtagc 540
caagarcgyt tgatcatgaa rtctgcggtg gaaatcgcsa aratgccraa gaartcktty 600
atygcwctct tyactggcaa cgartcwarc gaagaatggt tagatmagat cctmgyytct 660
gayaagccrt acgyagaaaa gatyaaarctk cacgaagaag acattcgtcg ttcaatcdcc 720
aagctaagag caattgaaga agaaacgtcg ctttcagtra rcaacatcaa agacatcagc 780
cgtcgtatgt ctatmggtga agcmaaagct cgccgtgcg 819

<210> 3

<211> 648

<212> DNA

<213>

<400> 3

ccaatgggcc gtatcggtga aatttttggt ccagaatctt caggtaaaac cacgttgacc 60
cttgagctga tcgctgcrge tcaacgtgaa ggcaaaactt gtgcgtttat cgatgcygag 120
cacgcgttrg atcctgtgta tgcgaagaar cttggcgawa atatcgacca rtrrttggtg 180
tctcagccyg ayacbggtga acaagcrttg gaaatctgtg atgckcttgc tcgctcaggk 240
gcggttgayg ttattgttgt cgaytctgtk gcmgcattga crcaaaggc agaaatyga 300
ggtgagatgg gygaytcgca catgggtctn caagctcgta tgctmtctca agcgatgcgt 360
aagytaacgg gkaacctaaa rcagtctaac tgtatgtgta tcttcatyaa ccagatycgt 420
atgaagatyg gkgatgatgt tggtaycca gaaaccacaa crggtggtga cgcwctgaaa 480
ttctacgctt ctgtwcgtct tgatattcgc cgtactggtg cratcaaaga aggygatgag 540
gtmgtgggta aygaaacgcg yatcaaagtg gtgaagaata agatcgctgc gccgtttaaa 600
gaagccaaya cycaaattat gtayggccar ggcwtttaacc gygaaggy 648

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

gtgtctggcg gtctt

15

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gatgcaccgc ttgctatcat c

21

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

tgcggactty acttcrct

18

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

gtccatgtag ctgttcart

19

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

ttgtctgcca tgaaggattc c

21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

aatcgacatc gctaamcga

19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gttcgacaaa gtacaagcg

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

tcaagcagyg attcagag

18

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

aatggcgcta gagaag

16

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

cktraatgaa catggtcga

19

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

gaactgatgc tcgatgtgtt t

21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

aatgtcttct tcgtgmagyt

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

ttgatgttgy tyactgaaag c

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

cctgtgtatg cgaagaarct t

21

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

tatcgaccar ttrttggta

19

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

aagmgcatca cagatttcca a

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

tcaaccgcmc ctgagcgagc a

21

【 0 0 2 3 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 4 - 2 0 は、プライマーである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

gyrB、rpoDおよびrecA遺伝子の部分配列を繋ぎ合わせた後に分子系統解析を行った結果を示した図。この図が近隣結合法による分子系統樹であり、ビブリオブルニフィカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属していることを示しており図中にV.v.という標記で記した。また、ビブリオブルニフィカス以外の系統をC1~C4に分類した。E. coli K12 及びV. cholerae N 16961株の遺伝子データはそれぞれGen BankデータベースのアクセシオンナンバーNC00913, NC002505を用いた。

【図 2】

図1で示したビブリオブルニフィカスが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中のC1, 2, 3）のgyrB遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることを示す。D=A又はG又はT、H=A又はC又はT、V=A又はC又はG、R=A又はG、Y=C又はT、K=G又はT、M=A又はC、S=G又はC、W=A又はT、N=A又はG又はT又はCを示す。

【図 3】

図1で示したビブリオブルニフィカスが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中のC1, 2, 3）のrpoD遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることを示す。D=A又はG又はT、H=A又はC又はT、V=A又はC又はG、R=A又はG、Y=C又はT、K=G又はT、M=A又はC、S=G又はC、W=A又はT、N=A又はG又はT又はCを示す。

【図 4】

図1で示したビブリオブルニフィカスが属するクラスターのrecA遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中のC1, 2, 3）のrecA遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオブルニフィカスに特異的な塩基であることを示す。D=A又はG又はT、H=A又はC又はT、V=A又はC又はG、R=A又はG、Y=C又はT、K=G又はT、M=A又はC、S=G又はC、W=A又はT、N=A又はG又はT又はCを示す。

=A又はC又はG、R=A又はG、Y=C又はT、K=G又はT、M=A又はC、S=G又はC、W=A又はT、N=A又はG又はT又はCを示す。

【書類名】 図面

【図 1】

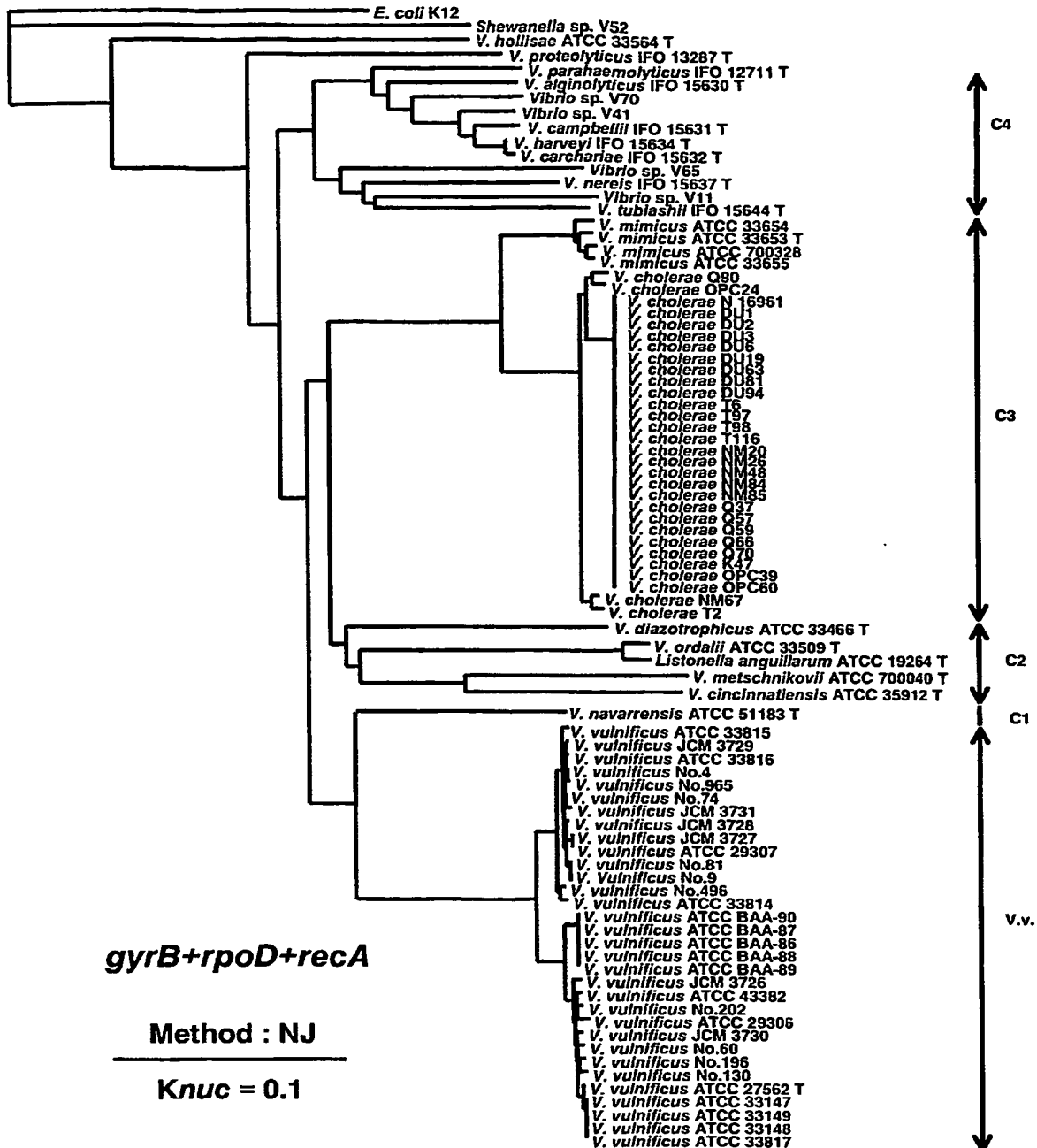


図1. *gyrB+rpoD+recA*配列に基づく分子系統樹

【図2】

gyrB-VV.con	1	GTGCTGGCGGTCTTCACGGGTGWTGGTGTTCGGTGGTAAACGCAATGTCGAAAAAGTR	60
2,3,4gyrB.con	1	..H..N..Y..YY.R..Y..B..H..K..K..H..N..B..Y..V..N..W.....D	60
		
gyrB-VV.con	61	CTRYTKACGATTTCATCGTGGTGGTCATACYCAYAGCCAAACCTATCGTCATGGTGTGCCT	120
2,3,4gyrB.con	61	YWD..N..Y..YY.Y..YRY..BVMN.YB...WCN.....B..YYRY..Y..B..D..D	120
		
gyrB-VV.con	121	GATGCACCGCTTGCATCATCGGCGATACYGAAAAAACCGGTACCGGTACGTTTCTGG	180
2,3,4gyrB.con	121	C.A.YH..VY.RDSBG.DG.H..W..D..N..DMRH..H..D..H..VB..D..Y..Y..	180
		
gyrB-VV.con	181	CCAAGTGCKSAAACCTTCASCAACATCGAATTTCAATTATGACATCCTAGCGAAGCGTTTA	240
2,3,4gyrB.con	181	..D..Y..H..V..B..Y..C...Y..Y....Y..Y..Y..H..YY.N..T..R..Y..R	240
		
gyrB-VV.con	241	CGTGAGCTCTCTTCTGAACTCKGCGGTGTCKATCAAACTGTTGATGAGCGCGAAGAA	300
2,3,4gyrB.con	241	..Y..R..B..W...Y.R..Y..W..B..N..V..YMRDY.RHHN..Y..R..H...MR	300
		
gyrB-VV.con	301	GATAAGRAAGATCACTTCATGTATGAAGGTGGTATTCAAGCGTTTGTACTCACTTGAAC	360
2,3,4gyrB.con	301	..Y..RM.M..Y..Y..Y.KR..Y....K..K..YMR...R.....KRSY..YY.N..Y	360
		
gyrB-VV.con	361	CGCAACAARACMCCCATCCATGAAAAAGTATTCATTTTAAAYKCYGAGCGTGAAGACGGK	420
2,3,4gyrB.con	361	..Y..Y..A..B..V..Y.....V.....V.....Y....R.HMW..V.....M..Y..B	420
		
gyrB-VV.con	421	ATTGCKGTTGAAAGTGGCGATGCGATGGAACGATGGYTTCCAAGAAAACATCTACTGTTT	480
2,3,4gyrB.con	421	..YWSB..K.....V..V.....R.....Y..Y.....RRY..Y.....Y...	480
		
gyrB-VV.con	481	ACCAACAACATCCACACGCGTGAYGGTGGTACCCACTTAGCGGGTTTCCGYGCGGCATTG	540
2,3,4gyrB.con	481	..Y..Y..Y..Y..D..R..Y..T..B..DR.H..Y..R..B..D.....SN..VY.R	540
		
gyrB-VV.con	541	ACGCGCACATTGAACAGCTACATGGACAAAGAAGGYTACTCRAAGAAAGCGAAAACCGCG	600
2,3,4gyrB.con	541	..B..H..B..N..Y..M..WY....H..R.....S.WYWSS..R.....SM..R.VK.R	600
		
gyrB-VV.con	601	ACTTCTGGYGAYGATGCGCGTGAAGGTTTGACYGCWGTGTTCAGTHAAAGTRCCGGAT	660
2,3,4gyrB.con	601	..V..X.....X.....Y..R..N..N..B..N..D..B.....D..D...	660
		
gyrB-VV.con	661	CCAAAATTCTCAAGCCAAACYAAAGACAAACTGGTTTCTAGYGAAAGTRAAGTCCGCAGTG	720
2,3,4gyrB.con	661	..W..R.....N.....Y..RY.R..B..MTCB..R.....RD.N..E..K	720
		
gyrB-VV.con	721	GAATCCTTCATGGCAGACAACTGAACGACTTCTTRGCGYCARCACCAGCGAAGCGGAAA	780
2,3,4gyrB.con	721	..R..DGCN...RRY..R..RY.BRMN..B..YY....N..M..Y..HMSY.....N...	780
		
gyrB-VV.con	781	ACCGTTTGTCTAAGATTATCGACGCCGACGTCGCGTGAAGCAGRCGTAAGCGCGT	840
2,3,4gyrB.con	781	MHV..B...WSN..E..Y..Y..T..V..D..H..N..Y....V..V.....N..B	840
		
gyrB-VV.con	841	GAAATGACRCGCGCTAAAGGGGCRRTTAGAYCTTGCTGGCCTTCCW	885
2,3,4gyrB.con	841	..R.....N..Y.....B..Y.V...Y.NR.W..YY.D..N	885
		

図2. *V. vulnificus*のgyrB遺伝子塩基配列特異性情報

【図3】

rpoD-VV.con	1	ACTCGTGAAGGCGAAATCGACATCGCTAAMCGAATTGAAGATGGTATCAACCAAGTACAG	60
2,3,4rpoD.con	1	..W..Y....Y..R..Y..T..Y..B..R..Y..Y....W....Y.....W..A	60
		
rpoD-VV.con	61	TCSTCTGTTGCTGAATACCCAGGAACCATTCCTTATATTCTKGAACAGTTCGACAAAGTA	120
2,3,4rpoD.con	61	HSYK.NR.K..Y..R..Y..H..H..N..Y..W..Y..YY.W..R..R..Y..YHRD..K	120
		
rpoD-VV.con	121	CAAGCGGAAGAACTTCGCCTMACTGATCTTATCAGTGGTTTTGTGTGATCCAAATGCAGAT	180
2,3,4rpoD.con	121	.WD..H..R..RY.W..YY.V..H..YM.N..YWSH..Y..YR.H..Y..DR.YKMRWB	180
		
rpoD-VV.con	181	GAAACGGCGCTCCAACCGCAACACACATYGGTTCAGAGCTTCAGAAATCTGATTTGGAA	240
2,3,4rpoD.con	181	.V.RSNRMF..N.....N..D..N..Y..C..Y..W..RY.ND.HRRNK.N..YC.N.MD	240
		
rpoD-VV.con	241	GATGAAGACAATACCGACATCGACGATGAAGACGAAGAYHNNHNGAAGATGGCGAT...	297
2,3,4rpoD.con	241	..Y..M..YRR.RMN.WYVMB..NSWY.....Y..D...GAVGAY.RM..YR..Y..HRRY	300
		
rpoD-VV.con	298	TCAAGCAGYGATTCTAGAGGAMGATGTCGGCATCGACCCCTGAAATGGCGCTAGAGAAATTY	357
2,3,4rpoD.con	301	DVMRVYDVHRRYDVY..W..A..DRYN..H..Y..Y....RS.B..DYKW..R..A...	360
		
rpoD-VV.con	358	ACTCARCTTCGTAACAGCTAYCAGAATCTGCAACTTGCCCTRAATGAACATGGTCGAGAG	417
2,3,4rpoD.con	361	.MYS..Y..D..YRRYMRV.W...RR.YB.D..RY.H..KRWH..Y..RYWY..YNYR.N	420
		
rpoD-VV.con	418	AGTGCTCAAACAGCTCAAGCCCATGAACCTGATGCTCGATGTGTTAAAGAGTTTCGTCTA	477
2,3,4rpoD.con	421	..YNHMHRRYBHMNS...NHHHRRVB.DR.RY.VRMDR.H..CMRH..R..Y..HY.V	480
		
rpoD-VV.con	478	ACDCCGAAGCAGTTTGACCATTTGGTTAACGAACCTCGCACCGCYATGGATCGCGTTCGT	537
2,3,4rpoD.con	481	..R..D..R..R..Y..YY.YY.N..HRMHRMD..DM.Y.HHK.D....W..Y..D..Y	540
		
rpoD-VV.con	538	ACKCAAGARCCGYTTGATCATGAARTCTGCGGTAGAAATCGCSAARATGCCRAAGAARTCK	597
2,3,4rpoD.con	541	..H.....Y..R.V...MRVD.N.YD..Y...DNM.SB.....D..R.....E	600
		
rpoD-VV.con	598	TTYATYGCWCTCTTYACTGGCAACGARTCNARCGAAGAATGGTTAGATMAGATCCTMGYY	657
2,3,4rpoD.con	601K.NB.V....H..Y..Y....NR.Y..N.MD...Y.N..YV.RR.NM.Y.CD	660
		
rpoD-VV.con	658	TCTGAYAAGCCRTACGYAGAAAAGATYAARCTKACGAAGAAGACATTCGTCTCAATC	717
2,3,4rpoD.con	661	W.H..H..R..W..Y..WSMV..RR.HMGHSMVV.H....VRHB..Y..Y..Y..W..Y	720
		
rpoD-VV.con	718	DCCAAGCTAAGAGCAATTGAAGAAGAAACGTCGCTTTCAGTEARCAACATCAAAGACATC	777
2,3,4rpoD.con	721	SMN..RY.DHRDRYB..Y..RS.R..R..N..WY.NDHK..DV.NHRY..Y.....Y..Y	780
		
rpoD-VV.con	778	AGCCGTCGTATGTCTATMGGTGAAGCMAAAGCTCGCCGTGCG	819
2,3,4rpoD.con	781Y..Y....W..Y....R..D....W..Y..D...	822
		

図3. *V. vulnificus*のrpoD遺伝子塩基配列特異性情報

【図4】

recA-VV.con	1	CCAATGGGCGGTATCGTTGAAATTTTGGGTCAGAAATCTTCAGGFAAAACACGTTGACC	60
2,3,4recA.con	1	..R....D..D..Y..H..RR..B..WY..Y..W....D..V..W....H..VY..R..H	60
		..*****	
recA-VV.con	61	CTTGAGCTGATCGCTGCGCTCAACGTGAAGGCAAAACTTGTGCGTTTATCGATGCTGAG	120
2,3,4recA.con	61	..K..RY..R..Y..NK..W..R..R..H..WR..Y....B....B..Y..Y....H..R	120
		..*****	
recA-VV.con	121	CACGCGTTRGATCCTGTGTATGCGAAGAARCTTGGCGTAAATATCGACCAATTETTGSTA	180
2,3,4recA.con	121	..Y..NY..N..Y..NR..Y..Y..BHRV...Y..S..B..B..B..YR..YS..DC..VY..B..B	180
		..*****	
recA-VV.con	181	TCTCAGCCYGAYACBGGTGAACAAGCRTTGGAAATCTGTGATGCKCTTGCTCGCTCAGGK	240
2,3,4recA.con	181	..W..R..W....Y..R....C..D....H....Y..NY..R..H..Y..T...	240
		..*****	
recA-VV.con	241	GCGGTTGAYGTTATTGTTGTCGAYTCTGTGKGMGCATTGACRCCAAAGGCAGAAATYGAA	300
2,3,4recA.con	241	..HR..N....B..B..BR..Y....N..N..D..NY..R....R..A..N..R....	300
		..*****	
recA-VV.con	301	GGTGAGATGGGYGAYTCGCACATGGGTCTNCAAGCTCGTATGCTMTCTCAAGCGATGCGT	360
2,3,4recA.con	301	..B..R....WSS..Y....B....R..D....Y..B..B....R....	360
		..*****	
recA-VV.con	361	AAGYTAACGGGKAACCTAAARCAGTCTAACTGTATGTGTATCTTCATYAACCAGATYCGT	420
2,3,4recA.con	361	..R..V..K..Y...Y..N....R..N..Y..Y....Y..Y....R....K	420
		..*****	
recA-VV.con	421	ATGAAGATYGGKGTGATGTTTGGTAAYCCAGAAACCACAACRGGTGGTAACGCWCTGAAA	480
2,3,4recA.con	421R....T.....Y..Y..C..W..R..H..M..N..Y....Y..N..D..R	480

recA-VV.con	481	TTCTACGCTTCTGTWCCTCTTGATATTCGCCGTACTGGTGCRATCAAAGAAGGYGATGAG	540
2,3,4recA.con	481	..Y..Y....D....YY..D....Y..Y....D..BK..D..Y....R..H..H..A	540
		..*****	
recA-VV.con	541	GTMGTGGGTAAYGAAACGCGYATCAAAGTGGTGAAGAATAAGATCGCTGCGCCGTTTAAA	600
2,3,4recA.con	541	..B..N..B.....N....Y..R..N..K..R..Y..R..Y..N..N..V....R	600
		..*****	
recA-VV.con	601	GAAGCCAAYACYCAAATTATGTAYGGCCARGGCWTTAACCGYGAAGGY	648
2,3,4recA.con	601	S..R..BR....B..R..YM..K....H..A..BT..Y..Y....R..T	648

図4. *V. vulnificus*のrecA遺伝子塩基配列特異性情報

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオブルニフィカス検出・定量・同定用特異遺伝子増幅プライマーを作製すること。

【解決手段】 本発明者等は、ビブリオブルニフィカス及びその近縁種のgyrB遺伝子、rpoD遺伝子、及びrecA遺伝子の部分塩基配列を決め、その系統関係を明らかにし、ビブリオブルニフィカスに特徴的塩基を同定し、これを含む高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計することを可能とした。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 5 5 1 2 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 3 4 9 7 0]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 5 月 3 1 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区築地 6 丁目 1 9 番 2 0 号

氏 名

株式会社ニチレイ